

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های بروسلا ملی تنفسیس جدا شده از خون بیماران با روش MIC

دکتر هادی پیری دوگاهه^۱، مرضیه علی قلی^۲، دکتر محمد حسین دهقان^۳، دکتر پرویز مالک نژاد^۴

E-mail: h.peeridogaheh@arums.ac.ir

^۱ استادیار میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
^۲ مری میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ^۳ دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ^۴ استاد میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوز یکی از شایعترین بیماری های مشترک بین انسان و دام است و بروسلوز انسانی در تمام نقاط ایران آندمیک می باشد. تعداد بیماران ثبت شده در سال ۱۹۸۸، هفتاد یک هزار و ۵۱ نفر (۱۳۲/۴ در هر صد هزار نفر) بود. بدليل اینکه گونه های بروسلاباکتری های درون سلولی اختیاری می باشند تعداد محدودی آنتی بیوتیک بر این ارگانیسم ها موثر می باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی ۷۴ سویه بروسلا ملی تنفسیس جدا شده از نمونه های بالینی انجام شده است.

روش کار: حساسیت آنتی بیوتیکی ۷۴ سویه بروسلا ملی تنفسیس جدا شده از نمونه های بالینی در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهاری MIC (Minimal Inhibitory Concentration) مواد ضد میکروبی مورد آزمایش توسط روش ترقیق آگار دایلوشن (Agar Dilution) انداز گیری شد. مقادیر MIC90 و MIC50 حداقل غلظت، آنتی بیوتیک در نظر گرفته شد که در آن غلظت به ترتیب رشد ۹۰٪ و ۵۰٪ سویه ها مهار گردید. جهت تفسیر نتایج از معیارهای National NCCLS (Committee for Clinical Laboratory Standards) برای باکتری های کند رشد استفاده شد.

یافته ها: تتراسیکلین (MIC50: ۰.۱۳)، میکرو گرم/ میلی لیتر (MIC90: ۰/۰۵) و استرپتومایسین (۰/۰۰۳)، MIC50: میکرو گرم/ میلی لیتر (MIC90: ۰/۰۵) حداقل غلظت مهاری را در آزمایشگاه بر علیه سویه های بروسلا ملی تنفسیس داشتند. نور فلوکسازین بیشترین مقدار MIC90 را نشان داد (۸ میکرو گرم/ میلی لیتر). حساسیت بیش از نیمی از سویه های بروسلا نسبت به ریفارمپین کاهش یافته بود. (مقدار حداقل غلظت مهاری ۲ میکرو گرم/ میلی لیتر)

نتیجه گیری: سویه های بروسلادر آزمایشگاه نسبت به اکثر آنتی بیوتیک هایی که در درمان بروسلوز به کار می روند حساس می باشند. در ایران برای آنتی بیوتیک هایی که بر علیه گونه های بروسلا به کار می روند مقاومت قابل ملاحظه ای مشاهده نگردید. با وجود این، از انجائیکه ریفارمپین برای درمان بیماری های شایع چون سل بطور وسیع مورد استفاده قرار می گیرد. باید الگوی حساسیت منطقه ای ریفارمپین بصورت دوره ای مورد بررسی قرار گیرد

واژه های کلیدی: روش آگار دایلوشن، حساسیت آنتی بیوتیکی، بروسلا ملی تنفسیس، حداقل غلظت مهاری

پذیرش: ۰۳۰/۱۰/۸۶

دریافت: ۱۱/۱۱/۸۵

شده اند در حالی که طی سال های اخیر شیوع بیماری در سراسر جهان رو به افزایش می باشد [۱]. بروسلوز در بسیاری از نقاط جهان آندمیک بوده و در کشورهای در حال توسعه از شیوع بالایی برخوردار است. در ایران بروسلوز انسانی در تمام نقاط کشور آندمیک است و

مقدمه

بروسلوز یکی از شایع ترین بیماری های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی است و بروسلا ملی تنفسیس شایع ترین عامل ایجاد بیماری می باشد. تنها ۱۷ کشور در دنیا به عنوان کشورهای عاری از بروسلوز شناخته

هر یک از این رژیم‌های دارویی مضراتی را به همراه دارد. استرپتومایسین باید به صورت تزریق عضلانی به مدت ۲ تا ۳ هفته تجویز شود. اما تزریق‌های مکرر برای بیمار آزار دهنده است تجویز استرپتومایسین و تتراسیکلین در خانم‌های حامله و تتراسیکلین در کودکان کمتر از ۸ سال به دلیل تأثیر بر دندان‌ها، مجاز نیست. این ترکیب‌های دارویی نتایج خوبی دارند [۱۱-۱۲] و نسبت عود در ترکیب درمان ۳۰ روزه استرپتومایسین و تتراسیکلین بین ۴/۸-۰/۸ درصد بوده و در ترکیب تتراسیکلین و ریفامپین با دوره درمان بر ۳۸/۸٪ و دوره درمانی ۶ هفته‌ای تتراسیکلین و استرپتومایسین برابر ۱۳/۴-۰/۱۳ درصد است [۱۲].

علاوه بر معایب رژیم‌های دارویی که در بالا ذکر شد، در زنان حامله‌ای که ریفامپین به تنهایی تجویز می‌شود عود بیماری نسبتاً بالاست، که خود ممکن است باعث بروز سویه‌های مقاوم گردد [۱۳، ۱۴].

در ایران نیز هیچ آمار و ارقام دقیق و قابل استفاده در مورد الگوی مقاومت و حساسیت بروسلای نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج در دسترس نمی‌باشد. این فقدان اطلاعات موجب درمان نامناسب همراه با صرف هزینه‌های نابجا برای بیماران است. وجود گزارش‌های منتشر شده از بعضی نقاط دنیا مبنی بر مقاومت بروسلای نسبت به برخی داروها مانند ریفامپین و ترمتوریم / سولفات‌کسازول و یافتن ژن مقاومت نسبت به ریفامپین [۱۵-۱۸] و نبود آمار درست، نیاز به مطالعه‌ای دقیق احساس می‌شود. آگاهی از الگوی مقاومت این باکتری موجب استفاده از داروهای مناسب در بیماران مبتلا می‌گردد که از میزان هزینه‌های اقتصادی درمان نیز خواهد کاست. ضمن این که نتایج و یافته‌های این طرح در پروتکل درمانی بروسلای مورد استفاده قرار خواهد گرفت. مطالعه حاضر با هدف بررسی کارآیی تاثیر مواد ضد میکروبی مختلف بر علیه سویه‌های بروسلای ملی تنسیس جدا شده از کشت خون انجام شده است.

تعداد بیماران با تشخیص قطعی در سال ۱۹۸۸، هفتاد و یک هزار و پنجاه و یک نفر بودند، که یکی از بالاترین مقادیر شیوع در جهان می‌باشد [۲]. بر اساس اطلاعاتی که مرکز مدیریت بیماری‌های عفونی منتشر کرده است، وضعیت ایران در مورد بیماری بروسلایز در حال بهتر شدن است. در سال ۱۹۸۹ موارد بروز سالیانه بروسلایز بیش از ۱۰۰۰ مورد در هر یک میلیون نفر بود، در حالیکه در سال ۲۰۰۳، موارد بروز سالیانه به ۲۳۸/۶ کاهش یافت. با وجود این هنوز بروسلایز انسانی بار سنگینی را بر جامعه تحمیل می‌کند [۳].

سازمان بهداشت جهانی (WHO)^۱ تعداد موارد جدید بیماری بروسلایز را در هر سال ۵۰۰ هزار مورد گزارش نموده است و این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده بروز بروسلایز انسانی می‌باشد [۴]. بروسلایز بیماری است با تظاهرات گوناگون که تمام بافت‌ها و اندام‌های مختلف انسان را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۵، ۶].

علایم بالینی فوق العاده غیراختصاصی است و تظاهرات بسیار متغیری را نشان می‌دهد. تظاهرات بیماری به صورت یک سندروم تبدیل همراه با علایم سیستمیک شامل لرز، تعریق، سردرد، کمردرد، بی‌اشتهاای و کاهش وزن بوده و یا به صورت گرفتاری‌هایی مانند آرتربیت، اسپوندیلیت، آندوکاردیت، منژیت، اپیدیدیموارکیت و غیره بروز می‌کند [۵]. درمان بروسلایز با آنتی بیوتیک باعث کاهش علایم، کاهش درد و همچنین کاهش عود بیماری و سایر عوارض ثانویه بروسلایز می‌شود. به دلیل تمرکز بروسلایها در داخل سلول‌های میزبان استفاده از داروهایی که قدرت نفوذ به داخل سلول‌ها را دارند ضروری به نظر می‌رسد. در درمان بروسلایز برای جلوگیری از بروز مقاومت از ترکیب دو دارو استفاده می‌شود. درمان معمول بروسلایز ترکیب از تتراسیکلین خوارکی به همراه استرپتومایسین تزریقی و یا ترکیب ریفامپین خوارکی و تتراسیکلین خوارکی است. به جای استرپتومایسین از جنتامایسین هم استفاده می‌شود [۶].

^۱ World Health Organization

کردن به روش فیلتراسیون در شیشه‌های درپیچ دار اضافه و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. توزین پودر استرپتومایسین جبیت تهیه محلول ذخیره براساس روش NCCLS و طبق فرمول زیر انجام می‌شود.

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{Volume(ml)} \times \text{concentration} (\mu\text{g/ml})}{\text{Assay potency} (\mu\text{g/ml})}$$

در این مطالعه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۲۴ تهیه گردید. این محلول تا ۶ ماه پایدار است.

تهیه محیط‌های کشت:

در این مطالعه از محیط کشت مولرهینتون آگار (Mast England) استفاده شد که پس از استریل کردن در دمای ۵۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد، هموگلوبین به میزان ۱٪ (bio Merieux France) polyvitex به مقدار ۱٪ اضافه شد سپس از استوک آنتی‌بیوتیک در polyvitex محیط مولرهینتون براث (سابلمنت شده با polyvitex به میزان ۰.۱٪) رقت‌های مختلف تهیه و به محیط‌های کشت اضافه گردید به طوری که محیط‌های حاصل حاوی آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های ۰.۰۰۲۵ تا ۰.۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر شدند. کلیه محیط‌ها پس از حصول اطمینان از نظر آلوده بودن مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی جبیت تلقیح:

از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط آگار خون ۴ تا ۵ کلنی برداشته و در لوله حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط برولسلا براث تلقیح و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمانه گذاری شدند به طوری که پس از انکوباسیون کدورتی معادل ۵/۰ مکفارلند (10^8 CFU/ml) داشته باشد.

از سوسپانسیون حاصل در محیط برولسلا آبگوشت رقت^۲ ۱۰ تهیه گردید به طوری که سوسپانسیون حاصل حاوی 10^6 CFU/ml باکتری بود. از سوسپانسیون حاصل به میزان ۱۰ میکرولیتر به محیط‌های کشت اضافه شد به طوری که در هر قطره 10^4 CFU/ml باکتری وجود داشت. پلیت‌ها در ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت CO_2 ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت گرمانه گذاری شدند. به محیط‌های مولرهینتون آگار تکمیل شده بدون آنتی‌بیوتیک نیز باکتری تلقیح

روش کار

در این مطالعه که برای تعیین MIC آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بروسلوز انجام شد، از ۵ سویه برولسلا که از بیماران مبتلا به بروسلوز توسط گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران جدا شده بود، استفاده گردید. مطالعه حاضر از نوع توصیفی- تحلیلی می‌باشد. روش نمونه گیری از نوع آسان و زمان انجام مطالعه در یک دوره یکساله (دی ماه ۸۴ تا دی ماه ۸۵) می‌باشد و برای آنالیز نتایج از روش‌های آمار توصیفی استفاده شد. باکتری‌ها در محیط تریپتیکیس سویبرات (TSB)^۲ کشت داده شده بودند که پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به آن گلیسرول اضافه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند.

تعیین MIC:

جبیت تعیین MIC از روش رقت در آگار (agar dilution)^۳ (NCCLS) و بر اساس استاندارد استفاده شد.

آماده‌سازی باکتری‌ها:

قبل از انجام آزمایش MIC، باکتری‌ها را از فریزر خارج کرده و دو بار بر روی محیط آگار خون کشت داده و در مجاورت ۱۰-۵ درصد CO_2 گرمانه گذاری شد. پس از حصول اطمینان از خالص بودن کشت باکتری‌ها از آنها جبیت تعیین MIC استفاده شد. از ۵ سویه‌ای که کشت مجدد داده شده بود ۳ سویه از دست رفته و آزمایش‌ها بر روی ۷ سویه انجام شد.

مراحل انجام تعیین MIC نسبت به استرپتومایسین

تهیه محلول ذخیره آنتی‌بیوتیک:

پودر استرپتومایسین از کارخانه زیگماتهیه گردید و چون طبق برگه آنالیز حلال و رقیق کننده این آنتی‌بیوتیک آب مقطر است پس از محاسبه و توزین پودر آب مقطر استریل به آن اضافه و پس از استریل

¹ Minimal Inhibitory Concentration

² Trypticase Soy Broth

³ National Committee for Clinical Laboratory Standards

انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی سی آب مقطر غلظتی برابر با $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ برای آنتی بیوتیک های تتراسیکلین و نورفلوکسین و غلظت آنتی بیوتیک $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ برای آنتی بیوتیک سیپروفلوکسین به دست می آید. از محلول آنتی بیوتیک های حاصله به محیط های کشت که دستور ساخت آن در بخش های قبل آمده است اضافه گردید تا محیط هایی با غلظت های مختلف آنتی بیوتیک ($0.0025-32 \mu\text{g}/\text{ml}$) به دست آید.

سویه های کنترل که در این تحقیق به همراه سویه های بروسلا مورد استفاده قرار گرفت عبارت ATCC 29212، E.Coli ATCC 25922، Pneumococcus ATCC 49619، Entro.faecalis Staph. aureus ATCC 9213 در مورد انجام آنتی بیوگرام و تعیین MIC برای باکتری بروسلا باید با خاطر داشت که دوز عفونت زای این باکتری بسیار کم و همچنین ذرات آئروسل این باکتری می تواند از راه دستگاه تنفس و مخاط چشم باعث آلودگی و بیماری انسان شود. لذا تمام مراحل انجام کار در زیر هود بیولوژیک و در هنگام کار از دستکش و ماسک استفاده شد.

نتایج

۴۷ سویه بروسلا که در این تحقیق بررسی شدند از بیماران مبتلا به بروسلوز جدا شده و همه بروسلا ملی تنسیس بودند. میزان MIC عوامل ضد میکروبی مطالعه شده با روش رقت در آگار در جدول یک آمده است.

جدول ۱. مقادیر ۵۰ MIC و ۹۰ MIC سویه های بروسلا مورد مطالعه

MIC 90 (mg/l)	MIC 50 (mg/l)	MIC ₅₀ دامنه (mg/l)	آنتی بیوتیک
.۲۵	.۱۳	.۰۰۱ - .۰۰۵	تتراسیکلین
.۲۵	.۰۰۰۳	.۰۰۰۲۵ - ۲	استرپتومایسین
۲	۱	.۰۰۵ - ۴	جنتامایسین
۲	۱	۱ - ۲	ریفارمپین
۲	.۰۷۵	.۰۵ - ۴	سیپروفلوکسین
۸	۲	۲ - ۸	نورفلوکسین

شد تا هم از رشد و زنده بودن باکتری آگاهی یافته و ضمناً از نظر آلودگی احتمالی نیز کنترل شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون پلیت ها را از نظر رشد باکتری ها بررسی کرده و کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که به طور کامل رشد را مهار کرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین MIC سویه های بروسلا نسبت به جنتامایسین:

در این تحقیق از محصول جنتامایسین کارخانه Mast انگلستان استفاده شد. براساس دستورالعمل کارخانه سازنده با حل کردن یک قرص در ۱۰۰ سی سی آب مقطر غلظتی برابر $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ به دست می آید. محیط های کشت همانند دستورالعملی که در مورد استرپتومایسین گفته شد تهیه گردید و آنتی بیوتیک با غلظت های مورد نظر به محیط های کشت اضافه شد به طوری که محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک به میزان ۰.۰۰۲۵ تا ۰.۰۳۲ میکرو گرم در میلی لیتر گردیدند.

تعیین MIC بروسلا نسبت به ریفارمپین:

در این تحقیق از پودر ریفارمپین (Merck Germany) استفاده شد. مطابق استاندارد NCCLS آنتی بیوتیک را وزن کرده و با توجه به این که حلال این آنتی بیوتیک متابول و رقیق کننده آب است، استوک ۱۰۲۴ تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از ساختن محیط کشت و اضافه کردن تکمیل کننده ها، از غلظت های آنتی بیوتیک که در محیط مولر هینتون براث سابلمنته تهیه شده بود. به محیط های کشت اضافه شدند تا محیط های کشت حاوی غلظت های آنتی بیوتیکی از ۰.۰۰۲۵ تا ۰.۰۳۲ میکرو گرم در میلی لیتر شوند. مطابق آنچه قبل گفته شد سوسپانسیون باکتری ها اضافه و کمترین غلظتی که موجب مهار رشد باکتری شده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین MIC بروسلا نسبت به تتراسیکلین، نورفلوکسین و سیپروفلوکسین:

در این مطالعه از محصول تتراسیکلین، Mast نورفلوکسین و سیپروفلوکسین کارخانه

سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین در نمودار یک آمده است.

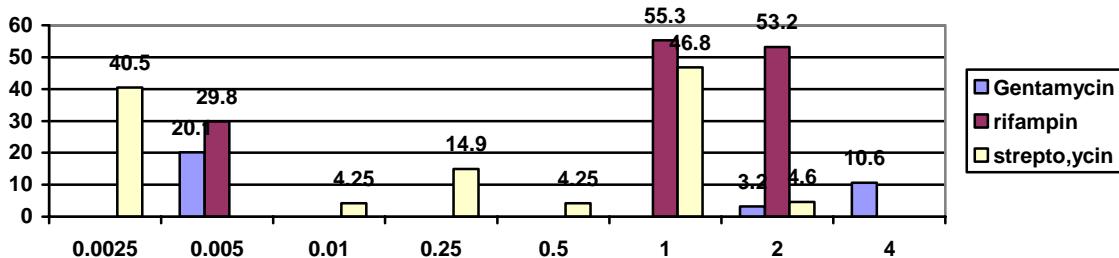
در بین کینولون‌های آزمایش شده، سیپروفلوکساسین دارای طیف $0.5\text{--}4 \mu\text{g/ml}$ MIC بوده که بیش از نیمی (46%) دارای MIC برابر ۱ بودند. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به سیپروفلوکساسین نمودار دو آمده است.

نورفلوکساسین دارای MIC بالاتری بین $2\text{--}8 \mu\text{g/ml}$ بود که $63\% / 88$ دارای MIC برابر $4 \mu\text{g/ml}$ بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به این آنتی‌بیوتیک در نمودار ۲ آمده است.

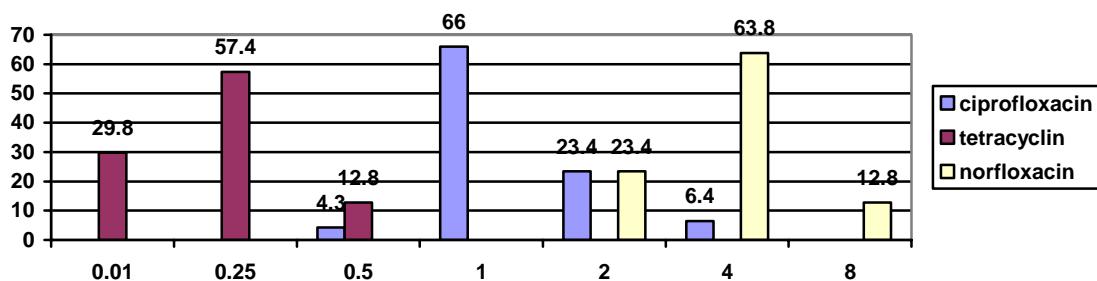
بحث

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عودهای مکرر در بیماری بروسلوز، شکست‌های درمانی با روش‌های متداول و فقدان اطلاعات در مورد حساسیت بروسلاها نسبت به داروهای رایج در درمان، ایجاب می‌کند که به بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بروسلاها پرداخته

تراسیکلین کمترین میزان MIC را در *in vitro* بر علیه بروسلا ملی‌تنسیس داشته است و دامنه آن بین $1\text{--}5\text{ }\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. بیش از نیمی از این باکتری‌ها (25%) میکروگرم در میلی‌لیتر بود، $12\% / 8$ دارای $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ MIC برابر $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند. فراوانی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به تراسیکلین در نمودار دو آمده است. در بین آمینو‌گلیکوزیدها، طیف MIC استرپتومایسین $25\text{--}200 \mu\text{g/ml}$ بود. فراوانی نسبی MIC سویه‌های بروسلا نسبت به استرپتومایسین در نمودار یک آمده است. طیف MIC جنتامایسین $4\text{--}50 \mu\text{g/ml}$ بوده و فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به جنتامایسین در نمودار ۱ آمده است. آن به ترتیب $1\text{--}2\text{ }\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. MIC سویه‌های بروسلا نسبت به ریفامپین فقط در غلظت‌های $1\text{--}2\text{ }\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده که $46\% / 53\%$ دارای MIC برابر $1\text{--}2\text{ }\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. فراوانی نسبی MIC



نمودار ۱. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ریفامپین و استرپتومایسین



نمودار ۲. فراوانی نسبی سویه‌های بروسلا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تراسیکلین و نورفلوکساسین

عربستان سعودی در سال ۲۰۰۰ میزان مقاومت نسبت به استرپتومایسین را ۶٪ اعلام کرده است [۲۳]. سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به این آنتی بیوتیک حساس بودند.

میزان MIC نسبت به جنتامایسین در مطالعه حاضر بین ۰/۰۵ تا ۴ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. میزان MIC_{50} برابر ۱ و MIC_{90} برابر ۲ میکروگرم در میلی لیتر بوده است که در مقایسه با نتیجه مطالعه سال ۲۰۰۶ ترکمنی یعنی ۰/۰۳۲ الی ۱/۵ و MIC_{90} برابر ۲ میکروگرم در میلی لیتر همخوانی دارد. ولی در مقایسه با نتیجه ۰/۵ مطالعه داهوک^۷ برابر بالاتر بوده است [۲۴]. این اختلاف احتمالاً به دلیل استفاده بیشتر از جنتامایسین در کشور ما بوده و یا ناشی از اختلاف در تعداد سویه‌های مورد مطالعه است. ریفامپین، یکی از داروهایی است که در رژیم درمانی بروسلوز توسط WHO توصیه می شود. میزان MIC سویه‌های بروسلوز در مطالعه حاضر بین ۰-۲ میکروگرم در میلی لیتر بود.

در مطالعه بوش میزان MIC ریفامپین، $\mu\text{g}/\text{ml}^4$ بوده است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در مطالعه ای که از عربستان سعودی یوسف خان منتشر کرد، طیف میزان MIC_{90} $0.02-0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ بوده است و میزان MIC_{50} آن 0.25 و MIC_{15} 0.15 بوده است که این ها از مقادیر به دست آمده از مطالعه حاضر کمتر می باشد [۲۱]. ولی در مطالعه رابینشتاین^۸ که از اسرائیل در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است MIC_{50} 0.05 و MIC_{90} 0.15 میکروگرم در میلی لیتر بود که از مقادیر مطالعه حاضر بالاتر بوده است [۲۵].

در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای در مکزیک توسط لوپز^۹ انجام شده که حداقل میزان MIC 4 میکروگرم در MIC میلی لیتر بوده [۱۷] که ۲ برابر حداقل میزان MIC مطالعه حاضر بوده است ولی میزان MIC_{90} آن برابر 2 میکروگرم در میلی لیتر که با مطالعه حاضر همخوانی داشته است. در مطالعه ترکمنی از ترکیه در سال ۲۰۰۶

شود. در این مطالعه طیف میزان MIC سویه‌های بروسلوز نسبت به تتراسیکلین $1-0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ بوده که کمترین MIC را دارد (جدول ۱).

در مطالعه فارل^۱ در سال ۱۹۷۶ میزان MIC همه تتراسیکلین‌ها کمتر از 1 mg/L گزارش شده است [۱۹]. در مطالعه بوش^۲ و همکاران در سال ۱۹۸۶ نیز میزان $MIC/5$ میکروگرم در میلی لیتر بوده که مشابه مطالعه حاضر است [۲۰]. در سال ۱۹۸۹ در عربستان سعودی توسط یوسف خان^۳ و همکاران بر روی 4 سویه بروسلوز مطالعه‌ای انجام دادند و میزان MIC را بین $0.01-0.06 \text{ mg}/\text{ml}$ گزارش کردند [۲۱]. در مطالعه رودریگز^۴ در اسپانیا در سال ۱۹۹۳ میزان $1-2 \text{ MIC}$ $0.1-0.2$ میکروگرم در میلی لیتر ذکر شده است [۱۲].

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای توسط ترکمنی^۵ در ترکیه انجام شده است که میزان MIC نسبت به تتراسیکلین را $0.03-0.15 \text{ MIC}_{90}$ برابر 0.05 میکروگرم در میلی لیتر گزارش نموده است [۲۲]. طیف میزان MIC سویه‌های بروسلوز نسبت به تتراسیکلین در مطالعه حاضر مشابه مطالعه رودریگز از اسپانیا در سال ۱۹۹۳ می باشد [۱۲] و نسبت به گزارش سال ۲۰۰۶ ترکمنی از کشور ترکیه پایین تر می باشد. در حالی که از کشور عربستان سعودی مقاومت $6/0\%$ توسط ممیش^۶ و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش شده است [۲۳]. تمام سویه‌های مطالعه حاضر نسبت به تتراسیکلین حساس بودند.

استرپتومایسین نیز در رژیم‌های درمانی یکی از ترکیبات مورد استفاده است. طیف میزان MIC در مطالعه حاضر $0.02-0.05 \text{ MIC}_{90}$ میکروگرم در میلی لیتر بوده است که نسبت به اکثر مطالعات انجام شده کمتر می باشد. میزان MIC_{90} در مقایسه با کشورهای همسایه مانند عربستان سعودی (۱۹۸۹) و ترکیه 2006 نیز پایین تر بوده است [۲۲, ۲۱]. در حالی که ممیش از

¹ Farrell

² Bosch

³ Yousef Khan

⁴ Rodriguez

⁵ Turkmani

⁶ Memish

⁷ Dahouk

⁸ Rubinstein

⁹ Lopez

سیپروفلوکسازین در مطالعه حاضر ۴-۵٪ میکروگرم در میلیلیتر بوده است.

طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا در مطالعه حاضر نسبت به سیپروفلوکسازین نسبت به همه مطالعات بالاتر بوده و تنها در مطالعه یامازهام^۲ از ترکیه در سال ۲۰۰۵ حداقل میزان MIC ۴ برابر حداقل میزان MIC در مطالعه حاضر بوده است. در حالی که MIC_{۹۰} گزارش از کشور ترکیه از MIC_{۹۰} مطالعه حاضر کمتر بوده است [۲۲، ۱۹]. این اختلاف در میزان MIC نسبت به کشورهای دیگر احتمالاً به علت استفاده بی‌رویه این آنتی‌بیوتیک در کشور ایران است. در مورد نورفلوکسازین مطالعات کمی صورت گرفته است. میزان MIC سویه‌های بروسلا مطالعه حاضر نسبت به نورفلوکسازین ۲-۸ میکروگرم در میلیلیتر بوده است. در مطالعه داهوک در سال ۲۰۰۴ میزان MIC ۳ میکروگرم در میلیلیتر بوده است. در سال ۲۰۰۶ از کشور ترکیه گزارشی از ترکمنی و همکاران منتشر شده است و میزان MIC را بین ۰/۲۵ تا ۴ میکروگرم در میلیلیتر گزارش کرده‌اند. حداقل میزان MIC در این مطالعه دو برابر حداقل میزان MIC در دو مطالعه فوق الذکر است [۲۴، ۲۲].

نتیجه‌گیری

افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌تواند یکی از دلایل شکست‌های درمانی در ایران باشد.

پیشنهادات

با وجود اینکه مقاومت آنتی‌بیوتیکی قابل توجه‌ای در سویه‌های بروسلا ملی‌تنسیس در مطالعه حاضر مشاهده نشد موارد زیر توصیه می‌شود:

- ۱- انجام آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) برای تمام سویه‌های بروسلا جدا شده از بیماران توصیه نمی‌شود. ولی در زمان مشاهده عود بیماری انجام تعیین MIC توصیه می‌گردد.

² Yamazham

طیف میزان MIC ۰/۹۴-۱/۵ و میزان MIC_{۹۰} ۰/۰۶-۱ mg/l سویه‌های بروسلا بین [۲۶] و میزان MIC ۰/۷۴ سویه از ۰/۰۶-۱ mg/l می‌باشد [۲۶] و مطالعه برابر ۰/۲ mg/l (نمودار ۱) بوده است. این سویه‌ها به عنوان غیرحساس در نظر گرفته شدند.

از طرف دیگر براساس NCCLS، باکتری‌های کند رشد با میزان MIC ۲ میکروگرم در لیتر حساس نسبی در نظر گرفته می‌شوند [۲۶].

یافته‌های مطالعه حاضر هشداری برای وقوع مقاومت نسبت به ریفارمپین در سویه‌های بروسلا در کشور به شمار می‌رود. در نتیجه استفاده از ریفارمپین در عفونت‌های غیرتوبرکولوزیس در مناطقی که انسیدانس بالایی از توبرکولوز وجود دارد باید با احتیاط بیشتری انجام شود و با وجود این محدودیت و رژیم‌های درمانی متداول بروسلاز می‌بایستی به دنبال عوامل آنتی‌میکروبیال جدید بود.

لزوم درمان ترکیبی، طول مدت درمان و نسبت شکست‌های درمانی با برخی رژیم‌های دارویی، بررسی و تحقیق در مورد داروهای جدید برای درمان بروسلاز را می‌طلبد. فلوروکینولون‌ها طیف فعالیت آنتی‌باکتریال گسترده‌ای دارند این داروها به صورت خوراکی بوده و به خوبی در سلول‌های فاگوسیتی نفوذ کرده و غلظت بافتی بالایی را ایجاد می‌نمایند و فعالیت خوبی بر علیه سویه‌های بروسلا در *in vitro* دارند [۲۶].

لذا توجه به استفاده از این داروها در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری‌های داخل سلولی جلب می‌شود. در این مطالعه بنابر نظر مشاور عفونی از بین فلوروکینولون‌ها از سیپروفلوکسازین و نورفلوکسازین که فعالیت متوسطی دارند ولی در ایران موجود می‌باشند، استفاده شده است. طیف میزان MIC سویه‌های بروسلا نسبت به

¹ Minimum Bactericidal Concentration

- ۴- با توجه به نتایج مطالعه حاضر به دلیل MIC پایین تتراسیکلین، استفاده از این دارو در درمان بروسلوز در اولویت قرار می گیرد. همچنین بعلت MIC پایین سیپروفلوکسازین در موارد لزوم به عنوان داروی جایگزین استفاده از این آنتی بیوتیک توصیه می شود.
- ۲- با وجود انسیدانس بالای توبرکولوز در کشور ایران لازم است که ریفامپین را برای درمان توبرکولوز حفظ نمود و در درمان بیماری های دیگر از قبیل بروسلوز به دنبال داروهای جایگزین بود.
- ۳- ارزیابی دوره ای جهت تعیین حساسیت سویه ها نسبت به داروهای متداول به خصوص ریفامپین توصیه می گردد.

منابع

- ۱- دست گلی کامران. منیری رضوان. ترجمه بروسلوز مادکورهم منیر، چاپ اول تهران، چاپ و نشر بنیاد ۱۳۷۱، صفحات ۶-۱۴.
- 2- Rafai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol.* 2002; 90: 81-110.
- 3- Pappas G, Papadimitriov P, Akritidis N, Christou L and Tsianos E. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6: 91-9.
- 4- World Health Organization. Fact sheet N 173, July 1997. World Health Organization, Geneva Switzerland
- 5- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*, 4th ed. Philadelphia: Mosby, 2002, 78-81.
- 6- Doganay M, Aygen B. Human brucellosis an overview. *Int Infect Dis.* 2003; 7: 173-82.
- 7- Solera J, Espinoza A, Martinez- Alfao E. Treatment of Human Brucellosis with Doxycyclosis and Gentamycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 80-4.
- 8- Cisneros J, Viciana M P, Colmenero J, Pachon J, Martinez C and Alarcon A. Multicenter prospective study of treatment of *Brucella melitensis* brucellosis with doxycycline plus streptomycin for 2 weeks. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34: 881-3.
- 9- Colmenero J, Hernandez DS, Reguera J M, Cabrera F, Rius F and Alonso A. Comparative trial of doxycycline plus streptomycin versus doxycycline plus rifampin for the therapy of human brucellosis. *Chemotherapy.* 1989; 35: 146-52.
- 10- Kosmidis J, Karagounis A, Tselentis J and Daikos G K. The combination rifampin-doxycycline in brucellosis is better than the WHO regimen. *Chimioterapia* 1982;1(Suppl. 4):107.
- 11- Navarro A, Pachon J, Cuello J A, Viciana P, Lopez L and Carneado J. Brucellosis: estudio prospectivo del tratamiento con tetraciclinas, estreptomicina y sulfadiacina en dos ciclos de tres semanas. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 1984; 2:274-275.
- 12- Rodriguez M, Gamo A, Moreno J. Evaluacion de dos regimenes en el tratamiento de la brucelloses: rifampicin- doxiciclina vs estreptomicina-doxiciclina. Resultados preliminares. *N Arch Fac Med.* 1985; 43:171-175.
- 13- Garcia-Rodriguez A J, Munoz Bellido L J, Fresnadillo M J and Trujillano I. In Vitro Activities of New Macrolides and Rifapentine against *Brucella* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1993; Apr, 911-913
- 14- Llorens-Terol J, Busquets RM. Brucellosis treated with rifampin. *Arch Dis Child.* 1980; 55: 486-8.
- 15- Rodriguez, M., L. Buz6n, M. Meseguer, J. Martinez, and E. Bouza. 1980. Rifampin as a single agent in the treatment of acute brucellosis in humans, p. 1064-66. In J. D. Nelson and C. Grassi (ed.), *Current chemotherapy and infectious diseases*, vol.2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 16- Dimitrove TS., Panigrahi D, Emara M, Awani F, Passadilla R. Seroepidemiological and microbiological study of brucellosis in kuwait. *Med Prince Pract.* 2004; Jul-Aug: 13(4): 215-9.
- 17- Lopez-Merino A., Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, Orrantia-Gradín R, Hernández-Oliva G M, Gutiérrez-Rubio YT et al. Susceptibility of México in brucella isolates to moxifloxacin,

- ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. Scand J Infect Dis. 2004; 36(9):636-8.
- 18- Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* spp. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5439-43.
- 19- Farrel ID, Hinchliffe PM, Robertson L. Sensitivity of *brucella* spp. to tetracycline and its analogues. J Clin Pathol. 1976; 29: 1097-100.
- 20- Bosch J, J Linares, MJ Lopez de Goicoechea, J Ariza, Cisnal and R. Martin. In vitro activity of ciprofloxacin, ceftriaxone and five other antimicrobial agents against 95 strains of *brucella melitensis*. J Antimicrobial Chemotherapy 1986; 17: 459-461.
- 21- Yousef Khan M, Dizon M and Kiel WF. Comparative in vitro activities of Ofloxacin, Difloxacin, Ciprofloxacin and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1989; Aug, p 1409-10.
- 22- Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F and Tselentis Y. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 5: 24.
- 23- Memish Z, Mah WM, Al Mahmoud S, Al Shaalan M and Yousuf Khan M. Brucella Bacteraemia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients. J Infect. 2000; 40: 59-63.
- 24- Al Dahouk S, Hagen RM, Nockler K, Tomaso H, Witting M, Scholz HC, et al. Failure of a short-term antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. Chemotherapy 2005; 51(6): 352-6.
- 25- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamantstein L, Joseph G, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1925-7.
- 26- Garcia-Rodrigues TA, Garcia Sanchez JE and Trujillano I. Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* sp. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1991; Apr, P: 756-9.